Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Verhalten von Gewicht, Glykogen- und Fettgehalt sowie von DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit der Leber der weißen Maus im Circadianrhythmus und bei der durch Pharmaka induzierten Lebervergrößerung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ingrid Niessing

aus Freiburg i. Br.

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Verhalten von Gewicht, Glykogen- und Fettgehalt sowie von DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit der Leber der weißen Maus im Circadianrhythmus und bei der durch Pharmaka induzierten Lebervergrößerung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ingrid Niessing

aus Freiburg i. Br.

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am 28. 5. 1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. W. Siegert
Referent: Prof. Dr. M. Siess
Correferent: Prof. Dr. med. W. Schmid

Inhaltsübersicht

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Methodik	7
	A. Tiermaterial	7
	B. Behandlung	7
	1. Phenobarbitalbehandlung	7
	2. Natriumphosphatbehandlung (Na_2HPO_4)	8
	3. Halothanbehandlung	8
	4. Kombination von Halothan-Phenobarbital	9
	5. Kontrolltiere	9
	C. Durchgeführte Untersuchungen	10
	1. Gewichtsbestimmungen	10
	a. Körpergewicht	10
	b. Lebergewicht	10
	2. Histologische Untersuchungen	10
	a. Autoradiographische Bestimmung von Einbau des H^3-Thymidins in die DNS der Leber- und Bindegewebszellkerne	10
	a1. Vorbehandlung der Tiere	10
	a2. Darstellung der Mitosen durch Colchizin	13
	a3. Kombination von Thymidinindex und Mitosestop mit Colchizin	13
	b. PAS-Reaktion	13
	3. Chemische Bestimmung der Neutralfette und Phosphatide in der Leber	14
	D. Auswertung	15
	1. Auszählung der Leberzellkerne mit H^3-Markierung und der Mitosen	15
	2. Art der statistischen Auswertung	17
III.	Versuchsergebnisse	18
	A. Tagesrhythmische Untersuchungen	18
	1. Tagesrhythmisches Verhalten des relativen Lebergewichtes männlicher weißer Mäuse im Monat März 1966	18
	2. Verschiebungen des Fettgehaltes (Neutral=fette, Phosphatide, Gesamtlipoide mg/1 g Leber)	18
	3. Tagesrhythmische Schwankungen des Glykogen=gehaltes der Leber	19
	4. Das Verhalten der DNS-Synthese und der Mitosehäufigkeit im Tagesrhythmus	19
	5. Untersuchungen zur Ermittlung der Mitose=häufigkeit in der Leber während eines Tages mit der Colchizin-Stop-Methode und das Verhalten des H^3-Index	20

6. DNS-Synthese der Kupfferschen Sternzellen 21
7. Colchizin-Stop-Methode über 24 Stunden 21

B. Untersuchungen über die DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit bei pharmakologisch induzierter Lebervergrößerung 22

1. Halothan 22
a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer 22
b. Bestimmung der DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit 24
2. Phenobarbital intraperitoneal und peroral 24
a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer 24
b. Bestimmung der DNS-Synthese und der Mitosehäufigkeit 28
3. Kombination von Halothan und Phenobarbital 28
a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer 28
b. Bestimmung der DNS-Synthese und der Mitosehäufigkeit 29
4. Na_2HPO_4 29

IV. Diskussion 30

1. Tagesrhythmische Schwankungen 30
a. Verhalten des Körpergewichtes 30
b. Verhalten des Glykogens 30
c. Verhalten des Fettgehaltes 31
d. Verhalten der DNS-Synthese 32
e. Verhalten der Mitosen 33
2. Untersuchungen über die durch Pharmaka induzierte Lebervergrößerung 34
a. Halothan 35
b. Phenobarbital 35
c. Halothan und Phenobarbital 36

V. Zusammenfassung 38

VI. Tabellenanhang 41

VII. Literaturnachweis 48

Einleitung

Frühere Untersuchungen am hiesigen Pharmakologischen Institut galten der eingehenden Analyse der Lebervergrößerung weißer Mäuse nach chronischer Einwirkung von Pharmaka (KUNZ, SCHAUDE, SCHMID, SIESS) (1966). Histometrische Untersuchungen ergaben, daß die Lebervergrößerung nach chronischer Einwirkung von Phenobarbital ohne Erhöhung der Gesamtleberzellzahlen einhergeht; die Lebervergrößerung beruht sowohl für das Verhältnis Lebergewicht zu Körpergewicht als auch für das Verhältnis Kern zu Cytoplasma auf einer unproportionierten Hypertrophie (PREIS, SCHAUDE, SIESS) (1966).

Biochemische Analysen (KUNZ, SCHAUDE, SCHIMASSEK, SCHMID, SIESS) (1966) ergaben, daß es sich bei dieser Hypertrophie nicht um eine Wasseraufnahme, sondern um eine echte Vermehrung von Proteinen und von RNS und DNS handelt. Damit erhob sich die Frage, wann die zur Lebervergrößerung führende chronische Substanzeinwirkung erste Veränderungen verursacht. Für ihre Beantwortung ist die Bestimmung des H^3-Thymidin-Indexes als Beurteilungskriterium der DNS-Synthese besonders geeignet. Hier sind Veränderungen nachweisbar, die möglicherweise mit biochemischen Methoden schlecht erfaßbar sind. Bei Bestimmung der DNS-Synthese durch den H^3-Thymidin-Index besteht außerdem der Vorteil der gleichzeitigen Kontrolle der Syntheseleistung bei den Endothelzellen.

Bei Durchführung dieser Versuche zeigte sich, daß zur Beurteilung einer verstärkten Syntheseleistung zunächst tagesrhythmische Schwankungen hinsichtlich der DNS-Syntheseleistung erfaßt werden müssen. Die Literaturangaben hierüber sind bis jetzt sehr uneinheitlich und zum Teil mit den unterschiedlichsten Methoden gewonnen. Über den H^3-Index in der Leber der weißen Maus liegen bis jetzt keine tagesperiodischen Befunde vor. BARNUM und Mitarbeiter (1958) beobachteten außerdem, daß diese Schwankungen nicht nur von Licht- und Tagesrhythmen, sondern auch von Stallbedingungen abhängig sind, was bei unseren Versuchen äußerst wichtig erschien.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher zuerst mit tages=rhythmischen Untersuchungen von Gewicht, Fett- und Glykogen=gehalt der Leber; als Muster für rhythmische DNS-Syntheselei=stung in der Zelle diente die Bestimmung des H^3-Index. Die Er=mittlung der Mitosehäufigkeit erschien uns wichtig für den physiologischen Zellumsatz bei Tag und in der Nacht.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die verschiedenen Typen der Lebervergrößerungen nach chronischer Behandlung mit Halo=than, Phenobarbital und mit der Kombination beider Substanzen in den ersten zehn Tagen untersucht.

II. Methodik

A. Tiermaterial

Die Versuche wurden an 228 männlichen weißen Mäusen des Reinzuchtstammes (NMRI Kisslegg) durchgeführt. Die Tiere waren in Tageslichtställen bei einer Raumtemperatur von 23°C untergebracht. Sie standen unter Dauerfütterung mit Trockenfutter Ssniff (Fa. Plange, Soest) und bekamen reichlich Trinkwasser.

B. Behandlung

Für die tagesrhythmischen Untersuchungen wurden die Tiere zu ganz bestimmten Tageszeiten nach den unten beschriebenen Behandlungsmethoden in den Versuch genommen. Die Tiere stammten aus den verschiedensten Gewichtsklassen. Kontrollversuche liefen gleichzeitig nebenher.

1. Phenobarbitalbehandlung

In dieser Versuchsanordnung wurde 18 Mäusen täglich 200 mg pro kg Körpergewicht Phenobarbital im Trinkwasser zugeführt. Dieser Tagesdosis lag die Berechnung zugrunde, daß eine Maus vom Körpergewicht 25 g durchschnittlich 5 ml Trinkwasser benötigt. Die Konzentration des Phenobarbitals im Trinkwasser betrug daher 0,1 %. Zwölf Tieren wurde täglich 0,1 % Phenobarbital injiziert. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Die zugeführte Dosis betrug auch hier 200 mg/kg und fand nur für Kurzzeitversuche Anwendung.

Bei den chronischen Langzeitversuchen über die Zeitdauer von 14 Wochen bekamen 6 Tiere täglich eine 0,1 %ige Phenobarbitallösung als Trinkwasser zugeführt. Bei dieser Untersuchungsserie konnte man im Vergleich zu den Kontrolltieren eine

zunehmende Unverträglichkeit beobachten, die sich in einer Neigung zu Beißereien äußerte.

Das Gewicht der Tiere für die Kurzzeitversuche schwankte von 24-30 g, während sie bei den Langzeitversuchen zu Beginn der Behandlung durchschnittlich 20 g wogen und am Ende des Versuches ein Durchschnittskörpergewicht von 35 g erreicht hatten.

2. Natriumphosphatbehandlung (Na_2HPO_4)

Zwölf Tieren wurde sekundäres Natriumphosphat intraperitoneal injiziert: Hier entsprach die zugeführte Menge wiederum 400 mg/kg Körpergewicht des einzelnen Tieres.

Sechs andere Tiere bekamen das Natriumphosphat im Trinkwasser zugeführt.

Der PH-Wert des Natriumphosphats in der Verdünnung 1:10 entsprach dem des Phenobarbitals von 8,5. Dieser Versuch diente dazu, die intraperitoneale Reizung, hervorgerufen durch Injektionen, von der peroralen Wirkung abzugrenzen, und zwar mit einer Substanz, die kein schädigendes Agens für den Organismus bedeutet.

3. Halothan-Behandlung

Insgesamt 24 Mäuse wurden mit Halothan behandelt. Zur Narkose kamen jeweils sechs Tiere in einen Exsikkator, der durch einen Thermoregulator auf einer Temperatur von 25°C gehalten wurde. Dieser Exsikkator stand mit einem Verdampfer ("Vapor" der Fa. Dräger, Lübeck) in Verbindung und wurde mit einem Gemisch von 1 % Halothan in Sauerstoff durchströmt. Alle Tiere kamen innerhalb von 60 Minuten in Vollnarkose (100 % Seitenlage).

Bei den Kurzzeitversuchen erfolgte die Behandlung vormittags, während bei den Langzeitversuchen diese Regelmäßigkeit nicht eingehalten wurde.

Eine Gewöhnung konnte bei den chronischen Versuchen festgestellt werden. Nach sechswöchiger Behandlung wurde die Narkose wesentlich flacher, d.h. nach Abbruch der Narkose kamen sie

sofort in das Exzitationsstadium, das 15-20 Minuten lang anhielt, während bei Tieren am Beginn einer Versuchsserie die Aufwachzeit, gemessen an dem sofort einsetzenden Exzitationsstadium, um fünf Minuten verzögert war. Die Nachschlafzeit (1/2 - 1 Stunde) war sowohl bei Kurz- als auch bei Langzeitversuchen unverändert.

Das Gewicht der Tiere für die Kurzzeitversuche war am 1. Tag 29,0 g; am 10. Tag wogen die Tiere 28,7 g ($\sigma_m = \pm 0{,}53$). Bei den chronischen Versuchen war ein Anfangsgewicht von 23 g und ein Endgewicht von 40 g festzustellen.

4. Kombination von Halothan und Phenobarbital

18 Tiere erhielten Phenobarbital von der Dosis 200 mg pro kg Körpergewicht im Trinkwasser und zusätzlich die einstündige Narkose mit 1 % Halothan. Diese Tiere schliefen nach der Halothannarkose wesentlich länger. Die Behandlung wurde ebenfalls als Kurz- und Langzeitversuch durchgeführt.

Bei den chronischen Versuchen hatten die Tiere anfangs ein Gewicht von 23 g, ein Endgewicht von allerdings nur 34 g, während die zugehörigen Kontrolltiere ihr Gewicht von 23 g auf 41 g steigern konnten.

5. Kontrolltiere

Zu den genannten Versuchsmethoden liefen jeweils fünf Kontrollgruppen mit einer Gesamtzahl von 21 Mäusen parallel. Alle Leberpräparate von diesen Tieren kamen zur histologischen Aufarbeitung.

C. Durchgeführte Untersuchungen

1. Gewichtsbestimmungen

a) Körpergewicht

Bei den chronischen Versuchen wurde einmal in der Woche das Einzelgewicht der Tiere bestimmt. Auch direkt vor der jeweiligen Tötung wurde das genaue Körpergewicht ermittelt. Zu diesem Zweck stand eine Tierwaage (Mettler K4) zur Verfügung, die eine Ablesung bis auf 0,1 g erlaubte.

b) Bestimmung des Lebergewichtes

Nach Tötung der Tiere durch Scherenschlag und Ausblutung wurde die Leber sofort von Zwerchfell und den größeren Gefäßen freipräpariert und auf einer Sartoriuswaage bis auf 10 mg genau gewogen. Danach kamen die verschiedenen Leberlappen zur histologischen Aufarbeitung. Der rechte große Leberlappen wurde für die Autoradiographie in einer Mischung von sechsprozentigem Formalin und 0,5 % Trichloressigsäure unter Zusatz von 0,1 mg pro ml inaktivem Thymidin mindestens 2 Tage fixiert. Der zweite Leberlappen kam zur Glykogendarstellung in eiskaltem 100%igen Alkohol p.a. Der Rest wurde zur quantitativen chemischen Fettbestimmung aufgearbeitet und in 10%igem Formalin fixiert.

2. Histologische Untersuchungen

a) Autoradiographische Bestimmung des Einbaus von H^3-Thymidin in die DNS der Leber- und Bindegewebszellkerne

a1. Vorbehandlung der Tiere

Entsprechend den Angaben von PILGRIM, ERB und MAURER (1963) bekamen die Tiere jeweils 40 Minuten vor der Dekapitation eine intraperitoneale Injektion von H^3-Thymidin (TRA. 120,

Thymidine-methyl-T, spezifische Aktivität 3,0 curies pro mMol, Amersham). Von 5 ml der Stammlösung mit 5 mCurie Gesamtaktivität wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt. Den Tieren wurde 0,1 ml i.p. appliziert; dies entsprach einer Dosis von 50 µCurie.

Für die Aufarbeitung der Leber waren mehrere Arbeitsgänge erforderlich: Zur Eliminierung der Fixiersubstanzen wurden die Lebern in fließenden Wasser 24 Stdn.gewässert. Die Entwässerung und Einbettung der Organe erfolgte nach folgendem Schema:

50% Alkohol	4 Stunden
70% Alkohol	6 Stunden
80% Alkohol	12 Stunden
96% Alkohol	24 Stunden
100% Alkohol I	24 Stunden
100% Alkohol II	24 Stunden
100% Alkohol III	24 Stunden
Chloroform I	2 Stunden
Chloroform II	2 Stunden
Chloroform-	
Paraffin weich aa	2 Stunden
Paraffin hart	über Nacht im Vakuum.

Daran schloß sich das Ausgießen, Aufblocken und Schneiden der Präparate (Schnittdicke 3 µ) an. Die Gewebsschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die zuvor mit Eiweißglycerin bestrichen waren. Auf einer 60°C warmen Heizplatte wurden die Schnitte durch Aufträufeln von "Streckwasser"

(10 ml	Aceton
0,15 ml	Methylbenzoat
0,5 ml	Eiweißglycerin
40 ml	Aqua dest.)

gestreckt.

Für die Vorbereitung der Präparate zur Exposition galt nachstehendes Behandlungsschema:

Entparaffinierung der Präparate durch Einstellen in

Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
Xylol III	10 Minuten
Alkohol absolut I	10 Minuten
Alkohol absolut II	10 Minuten
Alkohol absolut III	10 Minuten
Alkohol 96%	5 Minuten

Alkohol 80%	5 Minuten
Alkohol 70%	5 Minuten
Alkohol 50%	5 Minuten
Aqua dest.	10 Minuten

Waschen der Präparate in

Trichloressigsäure 0,5%	2 Stunden
inaktiv. Thymidin 0,5 mg/ml	1 Stunde

Abspülen der Präparate mit Aqua dest. und anschließend

Trocknen bei Zimmertemperatur.

Beschichtung der Objektträger mit einem Klebefilm durch Eintauchen in Chromalaun-Gelatine

(Gelatine 2,5 Gramm
Chromalaun 0,25Gramm
Aqua dest. ad 500 ml, Gemisch bei 37°C geschmolzen)

Zur sicheren Erkennung der Präparatengrenze in der Dunkelkammer erfolgte Markierung der Schnitte mit einem gelben Fettstift. Für die Arbeit in der Dunkelkammer mit Spezialfilmen (Kodak AR 10) ist "Kodak" Safe Light Filter rot I. vorgeschrieben.

Zunächst wurde der Film mit einer Schneidemaschine (Eigenkonstruktion der Werkstatt des Instituts*)) in gleiche Rechtecke geteilt. Der Film selbst kam in 20°C warmes Wasser, bis er sich nach ca. einer Minute von der Glasplatte gelöst hatte. Die Filmränder wurden mit der Fingerkuppe abgelöst und mit Hilfe von 2 Pinzetten über den Objektträger gezogen (Filmseite auf Präparat!).

Nach ca. 1 1/2 Std. der Trocknung wurden die Präparate für die zweiwöchige Exposition in schwarze Kunststoffkästen gestellt und durch Überkästen und Taschen doppelt lichtgesichert.

Entwickeln:

Die Präparate wurden in Entwicklerkörbchen eingeordnet und unter ständiger Bewegung in "Kodak" D-19b-Entwickler für fünf

---

*) Herrn Feinmechaniker A.OTTO sei an dieser Stelle besonders herzlich für seine Unterstützung und technische Hilfeleistung gedankt.

Minuten entwickelt. Dann schloß sich eine Zwischenwässerung in Leitungswasser (18°-20°C) für 30 Sekunden an. Im Fixierbad (18°-21°C) blieben die Präparate - wiederum unter ständiger Bewegung -, bis der Film klar war. Wässern im Fließwasser für 2-3 Minuten und nochmaliges staubfreies Trocknen. Jetzt konnten die Präparate mit Hämalaun 10 Minuten lang gefärbt und in Glyceringelatine eingedeckt werden und waren damit zur mikroskopischen Untersuchung bereit.

a2. Darstellung der Mitosen durch Colchizin (MERCK)

Zur besseren Darstellung der Mitosen wurde in einem Teil der Versuche 4 Std. vor Tötung 15 γ pro Tier Colchizin intraperitoneal injiziert. 15 mg Colchizin in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst; Injektionsmenge 0,1 ml/Tier.

Unter dem Gedanken, die Mitosen über einen ganzen Tag auflaufen zu lassen und sie durch den Mitosestop zu erfassen, ging man so vor, daß in einer Versuchsreihe alle vier Stunden sechs Kontrolltieren 15 γ Colchizin injiziert wurde, also 6 x 15 γ Colchizin. 4 Stunden nach der letzten Spritzung erfolgte die Tötung der Tiere durch Dekapitation. Um außerdem eine schwächere Gesamtdosis Colchizin zum Vergleich zu haben, schloß sich eine weitere Untersuchungsreihe an, in der wiederum im 4-Stundenversuch über 24 Std. 18 Kontrolltieren folgende Menge Colchizin gegeben wurde: 1 x 15γ, 2 x 10 γ und 3 x 5γ.

a3. Kombination von Thymidin-Index und Mitosestop durch Colchizin

Bei diesen Versuchen wurden jeweils drei Tiere nach Colchizinbehandlung 40 min. vor Tötung noch zusätzlich mit H^3-Thymidin, wie schon oben beschrieben, behandelt.

b) Histologische Glykogendarstellung mit der PAS Reaktion

In 100%igem Alkohol p.a. fixierte Leberstückchen wurden nach weiterer Entwässerung durch 100 %igen Alkohol p.a. über

Chloroform und Chloroform-Paraffin āā in hartes Paraffin eingebettet. Die 3 µ dicken Schnitte kamen zur Färbung nach folgendem Schema:

Zur Entparaffinierung diente

Xylol I
Xylol II
Xylol III
Alkohol 100% I
Alkohol 100% II
Alkohol 100% III

Danach wurden die Präparate mit 1-2 % Celloidin überzogen, das Härten dieses Filmes erfolgte in 80 % Alkohol. Zur Oxydation des Glykogens stand Perjodsäure zur Verfügung. Die Aldehydgruppen wurden im Schiffschen Reagenz (Parafuchsin) färberisch dargestellt. Anschließend kam die Differenzierung in schwefliger Säure und das Färben mit Hämalaun.

Zur Eindeckung in Rhenohistol wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol übergeführt.

3. Chemische Bestimmung der Neutralfette und Phosphatide in der Leber

1) Extraktion der Neutralfette, freien Fettsäuren und des Cholesterins

1 g Leber wurde in 50 ml Aceton vorextrahiert (Lagerung im Kühlraum bis zur Aufarbeitung). Danach kam die Trennung der Leberstückchen vom Aceton in einem Faltenfilter. Nach 1/4-stündiger Trocknung auf dem Filter Homogenisierung der Leber im Mörser. Homogenisierte Leber und abfiltriertes Aceton wurden wieder vermischt. (Aceton auf 50 ml ergänzt.) Extraktion bei 50°C erfolgte unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers (1/2 Std.), danach erneute Filtration.

Nochmalige Extraktion in 50 ml Aceton schloß sich an, und beide Filtrate wurden gemischt.

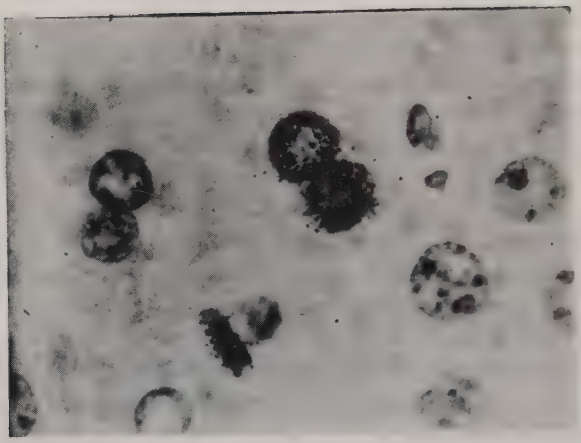
2. Extraktion der Phosphatide

Der Filterrückstand wurde im Extraktionskolben mit 50 ml Chloroform-Methanol Gemisch (2:1) extrahiert. Danach doppelter Extraktionsvorgang wie oben. Die Filtrate wurden mit dem Rotationsverdampfer auf 1-2 ml reduziert, im Trockenschrank getrocknet und das Gewicht des Rückstandes auf der Waage bestimmt.

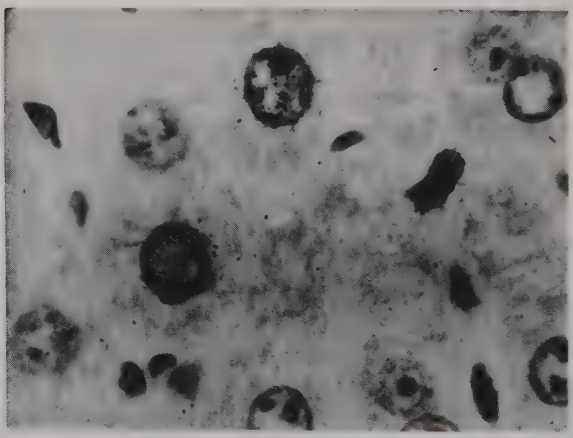
D. Auswertung

1. Auszählung der Mitosen und der Leberzellkerne mit H^3-Markierung

Mit dem Leitz-Mikroskop Ortholux wurden bei Ölimmersion (Objektiv 1:100) mit Okular 12 zunächst gesichtsfeldweise die Leberzellkerne ausgezählt. Die wahre Leberzellzahl ergab sich nach Abzug der doppelkernigen Zellen. Die Bestimmung der Endothelzellen erfolgte auf dieselbe Weise. Größere Gefäße und Gallengänge wurden ausgelassen. In einer zweiten Gesichtsfelddurchmusterung war anschließend die Zahl der Leberzellmitosen zu bestimmen und die markierten Leberzellkerne sowie die markierten Endothelzellkerne zu registrieren. Eine Zelle galt als markiert, wenn über ihrem Kern mehr als 10 Silberkörner zu erkennen waren (siehe Abbildung 1 a und b). Die Zahl der Silberkörner wurde in dieser Arbeit nicht ausgewertet. Zur Auszählung pro Präparat kam eine durchschnittliche Zellzahl von 15.000 bis 16.000. Dies entsprach je nach Größe des Präparates einer Zahl von 650 bis 850 Gesichtsfeldern. Die durchschnittliche Zeit zum Auszählen eines Präparates betrug 3/4 - 1 Std. Zur Registrierung der Kerntypen stand das Zählgerät "Leucodif" der Fa. Boscamp Bonn zur Verfügung.



a



b

Abbildung 1 a und b

Markierte Leber- und Kupffersche Sternzellen einer normalen Mäuseleber. H-E-Färbung. Vergrößerung 1:980.

2. Statistische Auswertung

Der Durchschnittswert der Mitosehäufigkeit der Leberzellen sowie der Zahl der markierten Leber- und Bindegewebszellkerne wurde für jede Versuchsgruppe errechnet und in Relation zu den schon oben beschriebenen errechneten Gesamtzellzahlen gesetzt. Mit diesen bekannten Zahlen ließ sich nunmehr der H^3-Index (prozentualer Anteil der markierten Zellen) und der Mitoseindex (prozentualer Anteil der Mitosen) bestimmen.

Tagesperiodische Schwankungen von Lebergewicht und Fettgehalt

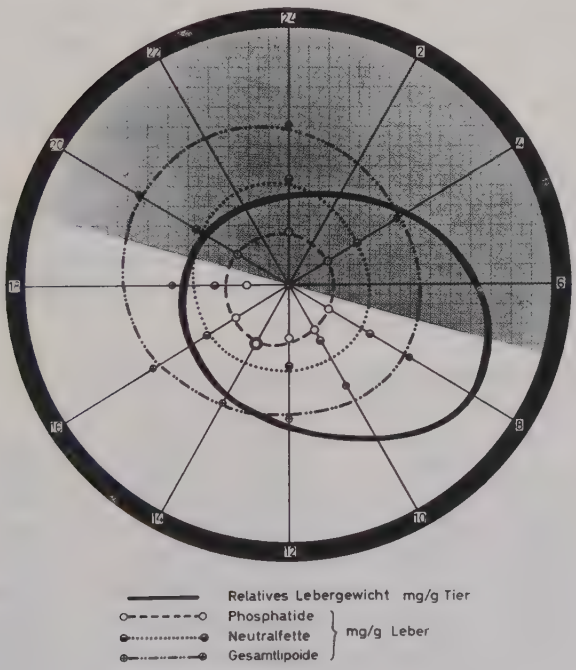


Abbildung 2

III. Versuchsergebnisse

A. Tagesrhythmische Untersuchungen

1. Tagesrhythmisches Verhalten des relativen Lebergewichtes männlicher weißer Mäuse im Monat März 1966

Aus Tabelle I und Abbildung 2 geht hervor, daß das relative Lebergewicht tagesrhythmischen Schwankungen unterworfen ist: danach hat das Gewicht sein Maximum morgens um 8 Uhr, fällt dann kontinuierlich bis 24 Uhr auf ein Minimum ab, der Zeitpunkt, zu dem die Tiere am aktivsten sind. Die Verschiebungen des relativen Lebergewichtes könnten durch drei Faktoren bedingt sein:

a. Änderungen des absoluten Lebergewichtes
b. Änderungen des Körpergewichtes, bedingt durch Nahrungsaufnahme
c. Kombination von beiden Möglichkeiten.

Die mittleren Werte der absoluten Lebergewichte zeigen, daß Tiere gleicher Gewichtsklassen dieselben Verschiebungen mitmachen. Das Körpergewicht hingegen läßt keine signifikante Änderung über die Streubreite erkennen.

2. Verschiebungen des Fettgehaltes (Neutralfette, Phosphatide, Gesamtlipoide mg/1 g Leber)

Zeit Uhr	K.G. g	abs.L. mg	rel.L. mg/g	Neutralf. mg/G	Phosph.L. mg/G	Ges.Lipoide mg/G
24	28,1	1496	53,1	54	27	81
4	27,5	1541	55,8	40	23	63
8	27,4	1619	58,9	47	23	70
10	28,0	1592	56,8	32	26	58
12	28,2	1667	59,0	41	27	68
14	27,5	1499	54,8	34	34	68
16	27,9	1542	55,3	48	31	79
18	28,7	1470	51,2	37	21	58
20	27,6	1518	53,9	54	30	87

Abkürzungen: K.G. = Körpergewicht
abs.L. = absolutes Lebergewicht
rel.L. = relatives Lebergewicht

Der Gesamtfettgehalt (mg/g) sowie die einzelnen Gehalte an Neutralfetten und Phosphatiden gehen mit der Gewichtsverschiebung der Leber nicht konform, sondern zeigen ihr Maximum zwischen 20 und 24 Uhr; die niedrigsten Werte liegen morgens zwischen 6 und 10 Uhr (Abb. 2).

3. Tagesrhythmische Schwankungen des Glykogengehaltes der Leber

Der histologisch mit der PAS Reaktion feststellbare Glykogengehalt zeigt die gleichen tagesrhythmischen Verschiebungen, wie sie in größeren Versuchsserien für den gleichen Stamm und unter den gleichen Stallbedingungen früher festgestellt wurden (SIESS, SCHMIDT, OEHMIG, KIRCHNER) (1963). Ein Tiefpunkt des Glykogengehaltes liegt zwischen 16 und 20 Uhr (bei älteren Tieren um 20 Uhr). Nachts um 24 Uhr und morgens um 8 Uhr sind die höchsten Werte zu verzeichnen. Der Wert für den Zwischenabfall morgens um 10 Uhr fehlt in unserer Versuchsreihe. Um 12 Uhr mittags ist der Glykogengehalt trotz eines erneuten kleinen Gipfels spärlich. Die Differenzierung zwischen zentral und peripher gelegenem Glykogengehalt entspricht im wesentlichen den früheren Angaben.

4. Das Verhalten der DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit im Tagesrhythmus (Abbildung 3 und Tabelle II)

Die Häufigkeit H^3-markierter Leberzellkerne zeigt eine ausgesprochene tagesrhythmische Abhängigkeit. Es wurden für diese Versuche Tiere in der Endphase des Wachstums (28-30 g) verwandt. Die Lebergewichte liegen mit 1400-1600 mg im kritischen Bereich, d.h. hier tritt bei der Maus bereits normalerweise ein Wachstum durch Zellvermehrung ein.

Die geringste Syntheseleistung ist nachts um 24 Uhr zu beobachten, während zwischen 4 und 8 Uhr morgens ein Maximum von 1,3% - 1,2% markierter Leberzellkerne zu verzeichnen ist.

Ein deutliches Absinken bis nachmittags 16 Uhr zeichnet sich anschließend ab. Ein zweiter Gipfel (0,69%) tritt um 20 Uhr auf.

Der Mitoseindex bei den Präparaten dieser Tiere, die 40 Minuten vor Tötung H^3-Thymidin injiziert bekamen, zeigt ebenfalls eindeutig einen Tagesgipfel, der gegenüber dem Thymidin-Index aber um 4 Stunden verschoben ist. Das Maximum von 0,56% liegt also bei 12 Uhr. Außerhalb dieser Zeit werden nur um 8 Uhr und 16 Uhr noch vereinzelt Mitosen von 0,08% bzw. 0,067% beobachtet. Ein zweites Maximum, entsprechend dem Thymidin-Gipfel, tritt nicht mehr ein. Das Mitosemaximum liegt um rund 50% niedriger als der H^3-Gipfel.

5. Untersuchungen zur Ermittlung der Mitosehäufigkeit in der Leber während eines Tages mit der Colchizin-Stop-Methode und das Verhalten des H^3-Index (Tabelle II)

Unter dem Gedanken mit Colchizin die Mitosen zu stoppen und über einen Zeitraum von 4 Stunden auflaufen zu lassen und damit die Gesamthäufigkeit der Mitosen zu bekommen, wurden Tiere 4 Stunden vor der Tötung mit 15 Colchizin behandelt und bekamen zusätzlich H^3-Thymidin wie oben schon beschrieben. Es fällt dabei auf, daß die Syntheseleistung, gemessen am H^3-Index, signifikant herabgesetzt wird. Trotzdem ist auch hier noch die tagesrhythmische Schwankung ausgeprägt. Der zweite Gipfel ist noch angedeutet.

Der Mitoseindex zu diesen Versuchen hat wiederum sein Maximum um 12 Uhr. Gegen 24 Uhr fällt allerdings die Kurve flacher ab. Bei 16 und 20 Uhr sind hier gegenüber dem H^3-Index höhere Werte von 0,28% und 0,13% zu verzeichnen.

Allein mit Colchizin behandelte Tiere zeigen nicht wie erwartet eine Zunahme der Mitosen, sondern eine Abnahme, wobei der Gipfel um 12 Uhr mittags wieder augenfällig ist (0,26%).

6. DNS-Synthese der Kupfferschen Sternzellen (Tabelle II)

Die DNS-Synthese in den Kupfferschen Sternzellen zeigt bei alleiniger Behandlung mit H^3-Thymidin zwei Gipfel, die zeitlich mit dem Maximum der markierten Leberparenchymzellen übereinstimmen. Der erste Gipfel liegt ganz deutlich mit 2,57% morgens um 4 Uhr. Der zweite Gipfel zeichnet sich um 20 Uhr mit 2,68% ab. Die Prozentzahlen liegen um 4 Uhr praktisch doppelt so hoch wie die Prozentzahlen für die markierten Leberzellzahlen. Um 20 Uhr ist ihre Zahl sogar um das Vierfache angestiegen (2,68%). Zu den übrigen Zeiten liegen die Werte sehr niedrig, so daß beide Spitzen sehr stark ausgeprägt sind.

Beim Kombinationsversuch dämpft Colchizin ebenfalls die DNS-Synthese und verschiebt den ersten Gipfel von 4 Uhr auf 8 Uhr (1,97%). Der zweite Gipfel verschwindet.

7. Colchizin Stop-Methode über 24 Stunden

Unter dem Gedanken, die Gesamtmitosen der Leberparenchymzellen während eines Tages mit Colchizin zu arretieren und auflaufen zu lassen, um auf diese Weise ein Bild über die Gesamthäufigkeit der Mitosen zu bekommen, wurden 6 Tiere mit 1 x 15 γ , 2 x 10 γ und 3 x 5 γ Colchizin behandelt und um 8 Uhr und 16 Uhr getötet; 40 Minuten vor Tötung bekamen sie zusätzlich Thymidin injiziert. In einer anderen Versuchsanordnung bekamen 6 Tiere Colchizin in der Dosis von 6 x 15 γ und andere 6 Tiere 1 x 5 γ, 2 x 10 γ und 3 x 5 γ injiziert. Die Tötung erfolgte morgens um 8 Uhr.

Im Vergleich zu den tagesrhythmischen Untersuchungen zeigt sich dabei sowohl in der Zahl der markierten Leberzellen als auch in der Mitosehäufigkeit ein so starker Abfall, daß Colchizin die DNS-Synthese in dieser hohen Dosierung mit Sicherheit hemmt. Berücksichtigt man, daß die Kupfferschen Sternzellen nach alleiniger Behandlung mit H^3-Thymidin um 8 Uhr und 16 Uhr mit jeweils 0,83% und 0,84% das Minimum erreicht haben, so liegen bei dieser Versuchsanordnung trotzdem die Werte von 0,14% und 0,12% weit unter dem Normalwert.

Die Rhythmusuntersuchungen dienten in erster Linie dazu, in vier-Stunden-Abständen den H^3-Index und Mitoseindex innerhalb von 24 Stunden zu ermitteln. Für jede Versuchsgruppe wurden nur drei Tiere genommen. Wie sich nachträglich herausstellte, ist diese Anzahl für die Errechnung einer statistischen Sicherung nicht ausreichend, da die Streubreite von Tier zu Tier doch sehr beträchtlich ist. Die in Abbildung 3 durch Mittelwerte errechneten Gipfel zeigen aber doch deutlich den Tagesrhythmus für Leberparenchymzellen und Mesenchymzellen.

B. Untersuchungen über die DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit bei pharmakologisch induzierter Lebervergrößerung

1. Halothan

a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer (Abbildung 4)

Entsprechend früheren Untersuchungen (KUNZ, SCHAUDE, SCHMID, SIESS) (1966) steigt das Lebergewicht bei erwachsenen Tieren unter täglich 1 Std. Beatmung mit 1% Halothan innerhalb von zehn Tagen signifikant an; eine Gewichtssteigerung des absoluten wie des relativen Lebergewichtes wird bereits ab dem zweiten Tage beobachtet. Bei dieser Versuchsanordnung scheint ein Anstieg des relativen Lebergewichtes rascher einzutreten.

Das Körpergewicht liegt während der Halothan-Behandlung in der normalen Schwankungsbreite mit der Tendenz nach dem unteren Streubereich der Kontrollen.

b. Bestimmung der DNS-Synthese und Mitose=häufigkeit (Abbildung 5 und Tabelle III)

Betrachtet man die Verschiebungen in der DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit, so zeigt sich während der ersten 48 Stunden keine signifikante Veränderung. Die Werte tendieren sogar gegen Null. Zu berücksichtigen ist hier allerdings, daß die Tiere um 15^{30} Uhr, dem Zeitpunkt des zweiten Tiefstandes für den H^3-Index, getötet wurden. Um so deutlicher tritt dann am fünften Tag eine Erhöhung des H^3-Index wie des Mitoseindex hervor. Die errechnete Statistik für den H^3-Index mit dem Wert $p < 0,05$ und für den Mitoseindex $p < 0,02$ ist damit deutlich gesichert.

Auch in der Markierung der Kupfferschen Sternzellen liegt der Wert von 1,83% am fünften Tag über dem Kontrollwert von 1,6%.

Nach zehn Tagen fallen alle Werte deutlich ab, ohne einen nochmaligen Gipfel zu erreichen.

2. Phenobarbital

a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer (Abbildung 6, 7)

Bei peroraler und intraperitonealer Applikation von Phenobarbital gleicher Dosierung zeigt sich hinsichtlich des Lebergewichtes und Körpergewichtes bei gleicher Wachstumstendenz kein Unterschied. Die Steigerung des relativen Lebergewichtes setzt bereits am ersten Tag ein und erreicht am fünften bis zehnten Tag sein Maximum. Das absolute Lebergewicht steigt erst am fünften Tag an, um dann ebenfalls am zehnten Tag einen Gipfel zu erreichen. Das Körpergewicht fällt sowohl bei intraperitonealer als auch bei peroraler Gabe in den ersten zwei Tagen zunächst ab, um sich dann den Ausgangswerten wieder zu nähern.

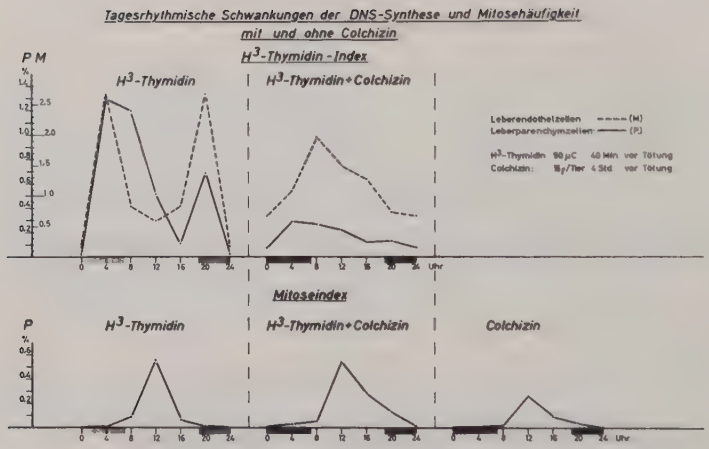


Abbildung 3

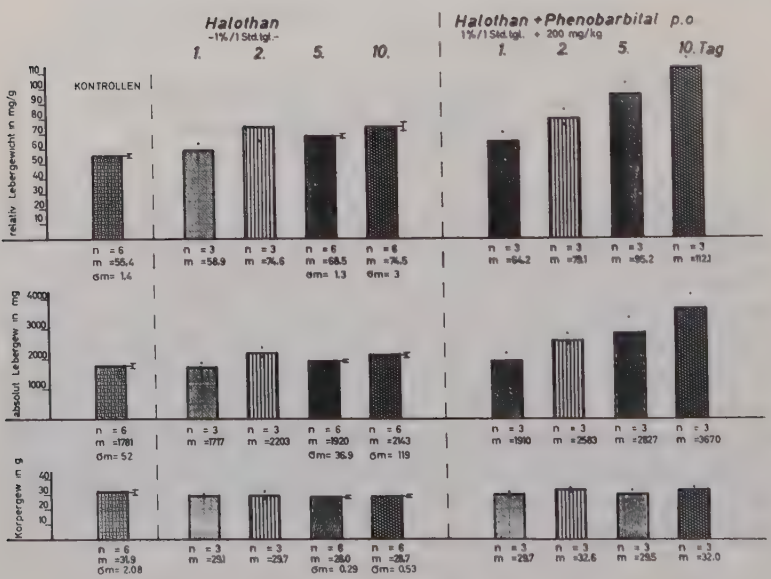


Abbildung 4

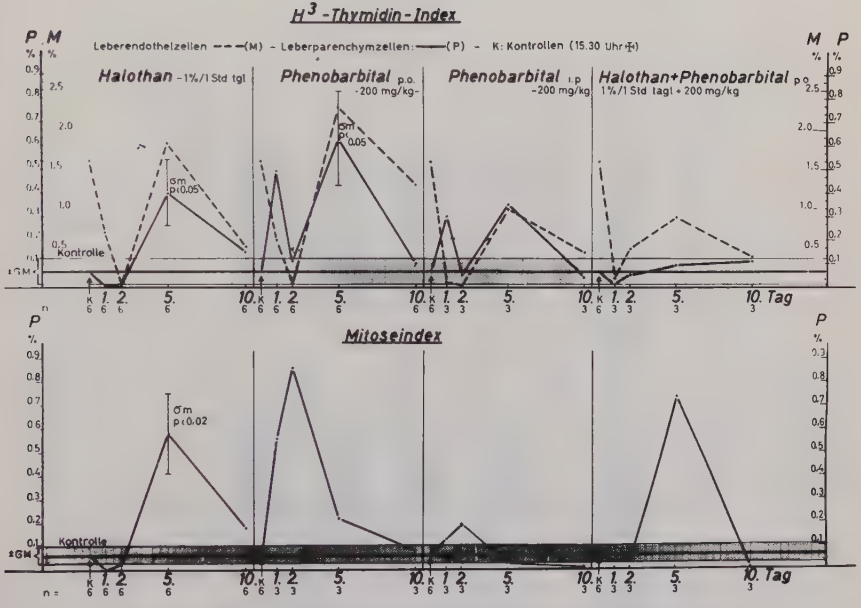

H³-Thymidin-Index
Leberendothelzellen ---(M) - Leberparenchymzellen: ——(P) - K: Kontrollen (15.30 Uhr ✠)
Halothan - 1%/1 Std tgl
Phenobarbital p.o. -200 mg/kg-
Phenobarbital i.p -200 mg/kg
Halothan+Phenobarbital p.o. 1%/1 Std tagl + 200 mg/kg
σm p<0.05
Kontrolle
K 1. 2. 5. 10. Tag
Mitoseindex
σm p<0.02
Kontrolle

Abbildung 5

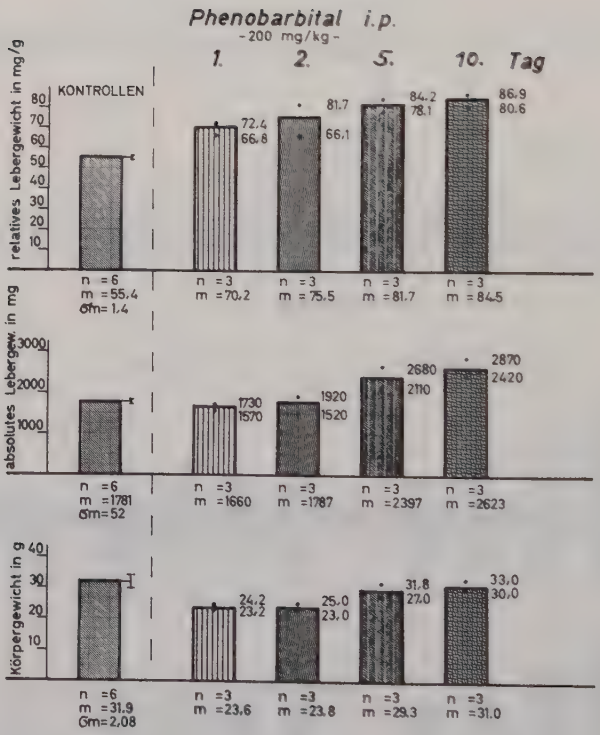

Phenobarbital i.p.
-200 mg/kg-
1. 2. 5. 10. Tag
relatives Lebergewicht in mg/g
KONTROLLEN
72.4
66.8
81.7
66.1
84.2
78.1
86.9
80.6
n =6
m =55.4
σm= 1.4
n =3
m =70.2
n =3
m =75.5
n =3
m =81.7
n =3
m =84.5
absolutes Lebergew. in mg
1730
1570
1920
1520
2680
2110
2870
2420
n =6
m =1781
σm=52
n =3
m =1660
n =3
m =1787
n =3
m =2397
n =3
m =2623
Körpergewicht in g
24.2
23.2
25.0
23.0
31.8
27.0
33.0
30.0
n =6
m =31.9
σm=2.08
n =3
m =23.6
n =3
m =23.8
n =3
m =29.3
n =3
m =31.0

Abbildung 6

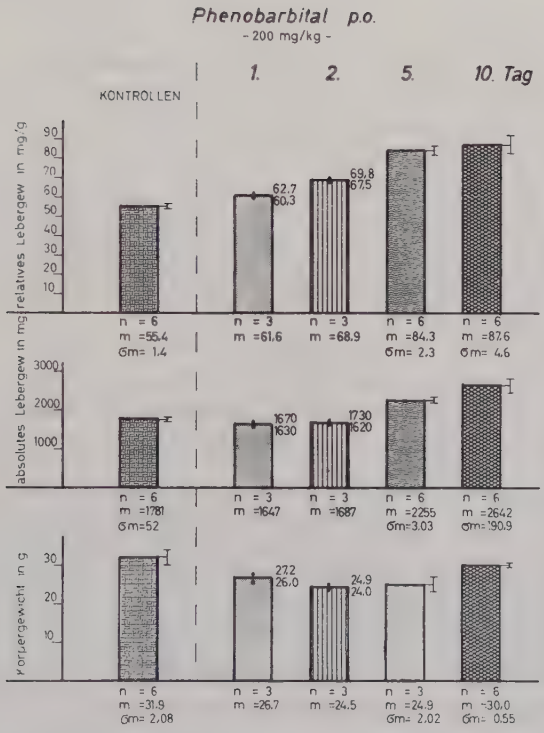

Phenobarbital p.o.
- 200 mg/kg -
1. 2. 5. 10. Tag
KONTROLLEN
relatives Lebergew in mg/g
absolutes Lebergew in mg
Körpergewicht in g
62.7
60.3
69.8
67.5
1670
1630
1730
1620
27.2
26.0
24.9
24.0
n = 6
m =55.4
σm= 1.4
n = 3
m =61.6
n = 3
m =68.9
n = 6
m =84.3
σm= 2.3
n = 6
m =87.6
σm= 4.6
n = 6
m =1781
σm=52
n = 3
m =1647
n = 3
m =1687
n = 6
m =2255
σm=3.03
n = 6
m =2642
σm=90.9
n = 6
m =31.9
σm= 2.08
n = 3
m =26.7
n = 3
m =24.5
n = 3
m =24.9
σm= 2.02
n = 6
m =30.0
σm= 0.55

Abbildung 7

b. Bestimmung der DNS-Synthese und Mitose-häufigkeit (Abb.5 und Tabelle III)

Übereinstimmend mit p.o. und i.p. Applikation zeigt sich, daß nach 24 Std. die DNS-Synthese in den Leberparenchymzellen einen kurzen Gipfel erreicht, wobei gleichzeitig die Syntheseleistung in den Kupfferschen Sternzellen abnimmt. Die untersuchten Werte der Tiere liegen weit über der 3 σ m-Grenze der Kontrollwerte. Die Mitosehäufigkeit steigt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls deutlich über die Kontrollwerte an.

Trotz gleichen Verhaltens der Leber sind die Veränderungen bei p.o. Applikation wesentlich ausgeprägter und statistisch zu sichern ($p < 0{,}05$), während bei i.p. Behandlung die Mitosehäufigkeit zu diesem Zeitpunkt nicht in die Statistik aufgenommen werden kann.

Nach 48 Std., zum Zeitpunkt der größten Mitosehäufigkeit, ist die Syntheseleistung der Leberparenchymzellen und der Kupfferschen Sternzellen auf ein Minimum abgesunken. Die Leber zeigt in dieser Zeit noch keine signifikante Vergrößerung gegenüber den Kontrollwerten.

Am fünften Tag, wenn die Lebervergrößerung am ausgeprägtesten ist, steigt der H^3-Index für Leberparenchym- und Mesenchymzellen auf ein Maximum an, während der Mitoseindex in die Streubreite der Kontrollen zurückgeht. Bei Erreichung des größten Lebergewichtes nach zehn Tagen ist kein Gipfel mehr für Leberparenchym-, Mesenchymzellen und Mitosen zu sehen.

3. Kombination von Halothan und Phenobarbital

a. Vergleich des Körpergewichtes und Lebergewichtes während der Versuchsdauer (Abb.4)

Die kombinierte Behandlung mit Halothan und Phenobarbital p.o. zeigt eine Vergrößerung des absoluten Lebergewichtes am zweiten Tag und erreicht ein Maximum ebenfalls am zehnten Tag. Das relative und absolute Lebergewicht ist zu diesem

Zeitpunkt gegenüber den Kontrollwerten praktisch verdoppelt. Die Vergrößerung ist damit wesentlich stärker als bei der Behandlung mit nur einer Substanz.

Das Körpergewicht liegt während dieser Zeit im Streube= reich der Kontrollen.

b. Bestimmung der DNS-Synthese und Mitose= häufigkeit (Abb.5 und Tabelle III)

Die Bewegungen des H^3-Index zeigen eigenartigerweise trotz der überaus starken Reaktion in Bezug auf die Lebervergröße= rung nur angedeutet einen leichten Anstieg bis zum zehnten Tag; sie liegen nicht signifikant außerhalb des Streuberei= ches. Der Mitoseindex zeigt ein Maximum am fünften Tag, was für alleinige Behandlung mit Halothan ebenfalls zutrifft.

4. Na_2HPO_4

Weiterhin zeigen die Kontrollen zu Phenobarbital, die mit Na_2HPO_4 (PH=8,5) intraperitoneal und peroral behandelt wurden, weder im Körpergewicht noch im Lebergewicht eine signifikante Veränderung. Das relative Lebergewicht bleibt während der beobachteten zehn Tage völlig im Kontrollbereich.

Auch die Auszählung der markierten Leberparenchymzellen und der vorhandenen Mitosen ergeben keine bedeutsame Verände= rung gegenüber der normalen Streubreite. Allerdings ist auch hier die höhere Markierung mesenchymaler Zellen gegenüber den Parenchymzellen deutlich.

IV. Diskussion

1. Tagesrhythmische Schwankungen

a. Verhalten des Körpergewichtes

JAFFÉ (1954) beobachtete tagesrhythmische Schwankungen des Körpergewichtes an Ratten. Er fand am Morgen den höchsten Gewichtsanstieg.

BARNUM und Mitarbeiter (1958) befaßten sich mit Schwankungen des Lebergewichtes bei weißen Mäusen. Hier stellte sich ebenfalls ein Tagesrhythmus heraus, denn das höchste Gewicht der Tiere lag morgens zwischen 6^{00} und 11^{00} Uhr, das niedrigste Gewicht lag abends um 18^{00} und 20^{00} Uhr.

Während in unseren Versuchen eine Verschiebung des Körpergewichtes gleicher Versuchsserien nicht beobachtet werden konnte, können wir die Schwankungen des Lebergewichtes bestätigen. Die Unterschiede zwischen den höchsten und niedrigsten Werten lagen mit 15% gegenüber 20% von BARNUM in der gleichen Größenordnung.

b. Verhalten des Glykogens

Die ersten Beobachtungen über tagesrhythmische Unterschiede im Glykogengehalt der Leber wurden von FORSGREN (1928), HOLMGREN (1936) und BARNUM et al. (1958) gemacht. Von BÄNDER (1949) kamen weitere Versuchsergebnisse und biologische Meßwerte hinzu. Für Atemfrequenz, Temperatur und Blutzucker fand er eine Aktivitätsperiode in der Nacht und eine Ruheperiode am Tag. Daß der Glykogengehalt - histologisch nachgewiesen mit der PAS-Reaktion - tagesrhythmischen Schwankungen unterliegt, wurde von SIESS, SCHMIDT, OEHMIG und KIRCHNER (1963) beschrieben. In den damaligen Versuchen zeigte sich in der Nacht von 24^{00} Uhr bis morgens 8^{00} Uhr der höchste Glykogengehalt, um dann abzufallen und einen weiteren kleinen Gipfel um 12^{00} Uhr zu erreichen. Es wurde untersucht, ob Unterschiede des Glykogengehaltes in der Leber bei alten und jungen

Mäusen bestehen. Dabei zeigte sich, daß bei jungen Mäusen der Glykogengehalt nach 8^{00} Uhr abfiel, um 12^{00} Uhr aber ein zweiter Gipfel erreicht wurde, um dann kontinuierlich zwischen 14^{00} und 18^{00} Uhr erneut abzufallen. Bei älteren Mäusen war der morgendliche Abfall des Glykogens nicht stark ausgeprägt, der Tiefpunkt zwischen 16^{00} und 20^{00} Uhr war allerdings sehr deutlich zu sehen.

Diese Beobachtungen stimmen mit unseren jetzigen Ergebnissen hinsichtlich der Glykogenserien bei nicht so großen Versuchsserien wie damals gut überein.

Biochemisch ermitteltes Glykogen in den tagesrhythmischen Untersuchungen von BARNUM (1958) ergaben ebenfalls in den Abendstunden zwischen 18^{00} und 20^{00} Uhr die tiefsten Werte, darauf folgte ein steiler Anstieg in der Nacht mit den Höchstwerten in den Morgenstunden zwischen 8^{00} und 10^{00} Uhr. Ein zweiter Gipfel war nicht festzustellen.

Wenn man annimmt, daß der Glykogengehalt der Leber auf das engste mit der Futteraufnahme und Aktivität der Tiere verbunden ist, resultiert verständlicherweise daraus ein Maximum in der Nacht. Bei unserer Tierhaltung ist erklärlich, daß sie im Rhythmus gestört werden, und zwar durch die Tierfütterung und das Misten der Ställe am Vormittag. Der zweite Gipfel könnte durch die Störung der Morgenruhe erklärt werden; am Nachmittag wird dann das Leberglykogen langsam abgebaut.

Frühere Versuche mit Narkotica behandelter Tiere hatten ebenfalls zu der Annahme geführt, daß fehlende Nahrungsaufnahme der Tiere nach einigen Stunden zu Glykogenverlust führt.

c. Verhalten des Fettgehaltes

Besonders auffällig sind in unseren Versuchen die Schwankungen des Fettgehaltes. Der höchste Gesamtfettgehalt liegt nachts zwischen 20^{00} und 24^{00}, und der niedrigste Wert ist morgens zwischen 6^{00} und 10^{00} Uhr zu finden. Die Phospholipide, die anteilmäßig gegenüber dem Gesamtfettgehalt etwa 40% ausmachen, zeigen ihre höchsten Werte zwischen 14^{00} und 20^{00} Uhr abends und den niedrigsten Wert morgens um 6^{00} Uhr.

Dies stimmt genau mit den Ergebnissen von BARNUM überein.

d. Verhalten der DNS-Synthesen

In unseren Versuchen weist die DNS-Synthese, gemessen am Einbau des H^3-Thymidins, eine zweigipflige Tagesperiodik auf, und zwar für Leberparenchym- u n d Mesenchymzellen, die beide zeitlich übereinstimmen. In der Nacht um 24^{00} Uhr sind die Werte am niedrigsten, dann steigt die Kurve für die Leberparenchymzellen steil an, um zwischen 4^{00} Uhr und 8^{00} Uhr morgens das Maximum zu erreichen (1,3%). Der zweite Gipfel um 20^{00} Uhr abends ist bei den Leberzellen schwächer. Für die Mesenchymzellen liegt der H^3-Index im Vergleich zu den Leberzellen abends viermal so hoch, morgens nur zweimal so hoch.

Die Synthesezeit für die Leberparenchymzellen beansprucht morgens eine längere Zeit, während bei den Mesenchymzellen das Maximum am Morgen durch einen steilen Anstieg und starken Abfall gekennzeichnet ist (s. Abb.3 und Tabelle II).

Eine Vorbehandlung mit Colchizin führt in allen Versuchen dazu, daß die Syntheseleistung herabgesetzt erscheint und der zweite Gipfel zwischen 18^{00} und 20^{00} Uhr verschwindet. Das Überwiegen markierter Mesenchymzellen gegenüber den Leberzellen bleibt davon nahezu unberührt.

Eine Rhythmik der DNS-Synthese wurde mit biochemischen Bestimmungen auch von BARNUM (1958) durchgeführt. Er stellte einen sehr steilen Anstieg des Einbaues von P_{32} in die DNS-Fraktion um 4^{00} Uhr morgens fest, der dann den Tag über kontinuierlich abfiel und um 20^{00} Uhr abends ein Minimum erreichte. Das absolute Minimum der DNS-Synthese lag zwischen 10^{00} und 24^{00} Uhr. Interessant ist in diesen Versuchen, daß das RNS-Maximum genau in der Zeit von 20^{00} und 24^{00} Uhr liegt, also um vier Stunden verschoben ist und mit dem Gipfel der Phospholipidsynthese nahezu übereinstimmt.

Von PILGRIM, ERB und MAURER (1963) wurden tagesrhythmische Schwankungen des H^3-Thymidin-Index in den verschiedenen Organen der weißen Maus beschrieben: der Tritium-Index blieb im Jejunum und Ileum den ganzen Tag über konstant, während sich ein ausgesprochener Gipfel um 17^{30} Uhr nachmittags an Oesophagus, Vormagen, Bauchhaut und Zunge zeigte. Die Mitosehäufigkeit lag hier in den frühen Morgenstunden um 5^{30} Uhr.

BADE und Mitarbeiter (1964) führten Versuche an der regenerierenden Leber der weißen Maus nach Teilhepatektomie durch. Die Teilhepatektomie lag mittags um 12^{00} Uhr, die Tiere wurden kontinuierlich zu bestimmten Zeitpunkten getötet. Hierbei zeigte sich, daß 35 Std. nach der Leberoperation um 22^{00} Uhr der erste Gipfel des H^3-Thymidin-Index lag, dann 11 Stunden später, um 9^{00} Uhr morgens, und nach weiteren 14 Stunden, um 23^{00} nachts zwei maximale Punkte der Syntheseleistung folgten.

Während unsere Beobachtungen über die Tagesrhythmik mit den Ergebnissen von BARNUM (1958) in den Morgenstunden gut übereinstimmen, sehen wir keine Kongruenz mit den anderen Tageszeiten.

Diese Beobachtung erscheint uns deswegen interessant, weil sie klar aufzeigt, daß durch einen direkten Eingriff in die Leber, wie sie die Teilhepatektomie darstellt, die Tagesrhythmik in Abhängigkeit von der Uhrzeit durchbrochen wird. Damit stellt sich ein Rhythmus ein, der wohl annähernd einem 12-Stunden-Zyklus folgt (11 Std. - 14 Std.), der aber völlig unabhängig vom biologischen Rhythmus ist. So wird in den Versuchen von PILGRIM, ERB und MAURER (1963) gerade um 23^{00} Uhr nachts, einem Zeitpunkt, bei dem unbeeinflußte Tiere in unseren Versuchen und in denen von BARNUM und Mitarbeitern ein Minimum der DNS-Synthese zeigten, "durch Zufall" (Wahl des Zeitpunktes der Hepatektomie) ein Maximum beobachtet.

e. Verhalten der Mitosen

Der Tagesrhythmus der Mitosen ist in vielen Arbeiten beschrieben worden.

Für uns erscheint wichtig, daß die Mitoserhythmik bei ein und demselben Tier in den verschiedenen Organen wechselt. Es fällt auf, daß bei den Organen mit ausgesprochen hohem Miteseindex, wie z.B. dem Jejunum, keine Tagesrhythmik gefunden werden konnte (PILGRIM, ERB und MAURER) (1963).

Wie schon oben erwähnt, liegt die größte Mitosehäufigkeit bei den Versuchen von PILGRIM, ERB und MAURER in den frühen Morgenstunden, während bei unseren Versuchen der höchste Wert mittags um 12^{00} Uhr zu verzeichnen ist, d.h. rund 4 bis 6

Stunden nach dem ersten Gipfel des H^3-Thymidin-Index.

Sehr auffällig ist in unseren Ergebnissen, daß der zweite Thymidin-Gipfel um 20^{00} Uhr abends nicht von einem zusätzlichen Mitosegipfel gefolgt wird.

Die Versuche zeigen eindeutig, daß der Quotient Mitosehäufigkeit zu H^3-Index nichts aussagt, wenn nicht die jeweiligen Maxima miteinander verglichen werden. Weiterhin sei betont, daß eine Synthesephase nicht unmittelbar mit einer Mitosephase im Zusammenhang stehen muß. Berechnungen über den Zellumsatz und über die Mitosedauer aus den gesamten Daten erscheinen daher sehr problematisch. Wir müssen die zweite Abendphase der DNS-Synthese der Leberepithelzellen von 16^{00} Uhr bis 20^{00} Uhr eher zu einer neuen Syntheseleistung mit Übergang in Polyploidie in Beziehung setzen. Für den hohen Prozentsatz der DNS-synthetisierenden Mesenchymzellen liegt die Deutung eines hohen Zellumsatzes nahe, da ja hier kein Volumenwachstum der Zellen wie bei den Leberepithelien eintritt.

Auffallend ist der Einfluß von Colchizin: da Colchizin vier Stunden vor Tötung gegeben wurde, liegt es nahe, anzunehmen, daß die Abnahme der DNS-Synthese auf diese Substanz zurückzuführen ist. Allerdings muß gesagt werden, daß der erste H^3-Index-Gipfel unbeeinflußt bleibt, der zweite Gipfel hingegen aber kaum sichtbar und damit abgeschwächt ist.

STÖCKER (1965) fand in seinen Untersuchungen keinen Einfluß des H^3-Thymidin-Index durch Colchizin, er hat allerdings keine tagesrhythmischen Untersuchungen durchgeführt.

Die Übereinstimmung in allen unseren Experimenten läßt auf eine sehr deutliche Herabsetzung der DNS-Synthese durch Colchizin schließen.

2. Untersuchungen über die durch Pharmaka induzierte Lebervergrößerung

Während bisher praktisch alle Untersuchungen über das Leberwachstum an der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie durchgeführt wurden, ist in den letzten Jahren die Lebervergrößerung nach chronischer Einwirkung von Fremdstoffen

auch für klinische Fragen in den Vordergrund getreten. Schon in früheren Untersuchungen ist nachgewiesen worden (PREIS, SCHAUDE, SIESS, 1966), daß es sich bei dieser Lebervergrößerung nach Phenobarbital in erster Linie um eine Hypertrophie und nicht um eine Hyperplasie handelt. Die Mesenchymzellen und Kapillaren wachsen nicht mit. Diese erste Phase der Lebervergrößerung ist bisher nicht untersucht worden.

Biochemisch konnte dagegen in der Frühphase bereits eine deutliche Veränderung und eine gesteigerte DNS-Synthese beobachtet werden.

a. Halothan (Tabelle III)

Übereinstimmend damit ergibt sich aus unseren Untersuchungen nach Einwirkung verschiedener Substanzen wie Halothan und Phenobarbital, daß in den Stadien der stärksten Lebervergrößerung nach 48 Std. und am fünften Tag eine ausgesprochen hohe DNS-Synthese zu beobachten ist. Bei Halothan-Einwirkung ist die hohe Syntheseleistung am fünften Tag zeitlich von einer gesteigerten Mitosephase begleitet (von 0,0021% bis 0,58%). Die H^3-Synthese steigt von 0,0043% bis 0,4%.

b. Phenobarbital (Tabelle III)

Phenobarbital verhält sich anders: hier tritt nach 24 Std. eine kurze Synthesesteigerung der Leberepithelien auf, die gleichzeitig von einer Abnahme der Synthese in den Mesenchymzellen gefolgt ist.

Nach 48 Std. ist ein Tiefpunkt für beide Zellarten erreicht, zu diesem Zeitpunkt wird ein maximaler Mitosegipfel erreicht. In dieser Zeit zeigt die Leber noch keine Vergrößerung.

Am fünften Tag ist ein hoher H^3-Index für Leberparenchym- und Mesenchymzellen nachzuweisen, während der Mitoseindex fast bis zur Norm wieder abfällt, ein Zeichen, daß Polyploidie und damit Hypertrophie der Zellen eintritt. Nach zehn Tagen nähern sich die Werte praktisch den Kontrollwerten, ohne daß das Lebergewicht absinkt.

Die verstärkte Syntheseleistung ist also nur während der

Phase der stärksten Vergrößerung nachzuweisen und nicht mehr zur Aufrechterhaltung des Lebergewichtes notwendig.

Diese Versuchsergebnisse treffen sowohl für perorale als auch für intraperitoneale Applikation des Phenobarbitals zu.

c. Halothan und Phenobarbital (Tabelle II,III)

Als wichtigster Unterschied bei dieser Behandlungsmethode ergab sich, daß der Anstieg der Mitosehäufigkeit am fünften Tag beobachtet wird, während nach zehn Tagen zum Zeitpunkt des maximalen relativen Lebergewichts wieder völlig normale Werte vorliegen. Der Thymidinindex lag zu den beobachteten Zeiten immer im Bereich der Norm.

Nach den Beobachtungen über den Tagesrhythmus und den Feststellungen von BADE über die Circadian-Rhythmik der DNS-Synthese nach Teilhepatektomie muß daran gedacht werden, daß durch den Eingriff in den Leberstoffwechsel mittels Pharmaka dieser biologische Rhythmus gestört werden kann.

Die beobachteten tagesrhythmischen Schwankungen, bedingt durch Futteraufnahme, Aktivität und Schlafrhythmen, lassen sich direkt oder indirekt in Licht- und Dunkelrhythmen einordnen. So vermuten BULLOUGH (1949) und JAFFÉ (1954), daß Zusammenhänge zwischen Nahrungsaufnahme, Kohlehydrat-Stoffwechsel und Mitoseperiodik bestehen.

Aus unseren Versuchen können wir keine Stellung zu diesen Problemen nehmen, da wir nicht wissen, ob wir durch die Phenobarbital- und Halothanbehandlung die biologische Tagesrhythmik verschieben.

Die höchsten H^3-Indexwerte für Leberepithelien mit 0,63% nach peroraler Phenobarbital-Einwirkung liegen wesentlich über dem Gipfel des beobachteten biorhythmischen Wertes um 16^{00} Uhr (0,12%).

Für die Mitosehäufigkeit beträgt der biorhythmische Wert um 16^{00} Uhr 0,28%, während die höchste Mitosehäufigkeit nach Phenobarbital (48 Std.) den Wert 0,86% zeigt.

KORANSKY und Mitarbeiter (1966) haben kürzlich berichtet, daß die Lebervergrößerung nach α-Chlorcyclohexan zuerst mit einer Erhöhung des H^3-Index und Mitoseindex einhergeht und glauben damit, daß die Lebervergrößerung allein auf einer

Hyperplasie beruht. In neueren Untersuchungen haben KORANSKY und Mitarbeiter (1967) eine Erhöhung der Kernzahl beobachtet (Leberzellen und Kupffersche Sternzellen).

Nach unseren früheren Befunden ist nach Halothan-Einwirkung eine Vermehrung der Leberzellen zu beobachten, wenn auch eine Hypertrophie der Zellen bei weitem überwiegt.

In unseren jetzigen Untersuchungen ist ebenfalls ein Unterschied zwischen Halothan- und Phenobarbital-Behandlung ersichtlich: Bei Phenobarbital eine erste DNS-Synthesesteigerung mit kurzer Mitosewelle, danach starke Syntheseleistung zur Zeit des ansteigenden Leberwachstums ohne Anstieg der Mitosehäufigkeit. Dies spricht eindeutig für Polyploidie zum Zeitpunkt der Lebervergrößerung und stimmt mit den früheren meßtechnischen Untersuchungen (PREIS, SCHAUDE, SIESS) (1966) überein. Nach Halothan tritt erst am fünften Tag zum Zeitpunkt des Leberwachstums ein Anstieg von Thymidin-Index und Mitoseindex ein.

Um quantitative Aussagen über die tatsächlichen Vorgänge in der DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit zu bekommen, müßte der Einfluß der genannten Substanzen auf die Tagesperiodik zuerst geprüft werden. Auf diese Weise dürfte es möglich sein, Circadian-Rhythmen von Tages- und Nachtrhythmen zu unterscheiden, um dadurch eine Aufklärung über Eingriffe von Medikamenten und Fremdstoffen in Biorhythmen zu gewinnen.

Eine weitere ungeklärte Frage ist, wieweit Thymidin-Injektionen die Mitosehäufigkeit erhöhen und beeinflussen. Der Mitoseindex von Tieren, die nicht mit H^3-Thymidin injiziert wurden, ist nach unseren bisherigen Beobachtungen auch zu Zeiten des höchsten Tagesrhythmischen Mitosegipfels um ein Vielfaches niedriger als von Tieren, die 40 Minuten vor Tötung 50 µ Curie Thymidin bekamen.

V. Zusammenfassung

An 228 männlichen Albinomäusen des Reinzuchtstammes NMRI Kisslegg wird das Verhalten von Gewicht, Fett- und Glykogengehalt, von DNS-Synthese und Mitosehäufigkeit der Leber im Tagesrhythmus des Normaltieres geprüft.

Es ergeben sich bemerkenswerte circadianrhythmische Schwankungen.

1. Das relative Lebergewicht zeigt ein Maximum um 8 Uhr und ein Minimum um 24 Uhr mit einer Differenz von 22 %.

2. Der Gesamtfettgehalt mit den Einzelkomponenten Neutralfette und Phosphatide liegt mit seinem Höchstwert zwischen 20 und 24 Uhr, die niedrigsten Werte findet man morgens zwischen 6 und 10 Uhr. Der Unterschied beträgt 40-50 %.

3. Für den Glykogengehalt bleiben die Höchstwerte um 8 und 24 Uhr und ein Tiefpunkt zwischen 16 und 20 Uhr entsprechend früheren Untersuchungen gültig. Ein Zwischenabfall um 10 Uhr fehlt.

4. Bei der DNS-Synthese - beobachtet am H^3-Thymidin-Index - der Leberparenchym- und -mesenchymzellen ist ein Minimum um 24 Uhr, ein Maximum zwischen 4 und 8 Uhr, deutliches Absinken bis 16 Uhr und schließlich ein zweiter Gipfel um 20 Uhr zu verzeichnen.

Die Mitosehäufigkeit der Leberzellen zeigt nur e i n e n Tagesgipfel, der gegenüber der Syntheseleistung um 4 Stunden auf 12 Uhr verschoben ist.

5. Nach einmaliger Injektion von 15 γ Colchizin 4 Stunden vor Tötung ist die Syntheseleistung unter zeitlicher Beibehaltung der beiden Maxima wesentlich erniedrigt. Der Gipfel zwischen 4 und 8 Uhr beträgt 1/4, der Nachmittagsgipfel um 16 Uhr 1/3 der nicht mit Colchizin vorbehandelten Gruppe. Im Verhalten der Mitoseleistung besteht gegenüber dieser letzteren Gruppe kein Unterschied.

6. Die Applikation von 15 γ Colchizin 4 Stunden vor Tötung

ohne H^3-Thymidin-Markierung führt im Vergleich mit den beiden vorhergehenden Gruppen zu einem gleichsinnigen Verlauf der Mitosetätigkeit mit entsprechendem, jedoch um 50% niedrigerem Tagesgipfel um 12 Uhr.

Ein- und mehrtägige Behandlung mit Halothan, Phenobarbital und der Kombination beider Substanzen zeigt charakteristische Merkmale.

1. Das Körpergewicht nimmt in allen Versuchsgruppen einen analogen Verlauf. Nach geringem initialem Gewichtsabfall bis zum 5. Tag folgt ein leichter Wiederanstieg bis zum Versuchsende am 10. Tag, wobei alle Werte im normalen Streubereich bleiben.

2. Absolutes und relatives Lebergewicht steigen kontinuierlich bis zu einem Maximum am 10. Tag an. Die höchsten Gewichte werden von der Kombination Halothan und Phenobarbital mit einer Steigerung um 100 % erzielt.

3.a. DNS-Synthese und Mitoseleistung der Parenchymzellen bewegen sich bei Halothan während der beiden ersten Behandlungstage im Streubereich der Norm, haben am 5. Tag ihr Maximum mit einer 4-5fachen Erhöhung des Kontrollwertes und sind am 10. Tag wieder bis an die Grenze des Normalbereichs abgefallen.

Für die Markierung der Kupfferschen Sternzellen resultiert in den beiden ersten Tagen ein starker Abfall der Syntheseleistung, nach 5 Tagen ein Anstieg wenig über den Kontrollwert und nach 10 Tagen erneutes Absinken unter den Normalwert.

b. Nach Kombination von Halothan und Phenobarbital wird ebenfalls ein Anstieg der Mitosehäufigkeit beobachtet. Trotz starker Lebervergrößerung wurde keine Erhöhung des H^3-Thymidinindex beobachtet. Die Frage einer'Verschiebung im Circadianrhythmus der DNS-Synthese während der durch Pharmaka induzierten Lebervergrößerung wird diskutiert.

c. Phenobarbitalbehandlung ergibt für Mitosen und DNS-Synthese des Parenchyms bei beiden Applikationsformen (p.o. und i.p.) nach 24 Stunden einen den Normalwert mehrfach übersteigenden Gipfel, wobei gleichzeitig die Syntheseleistung in den Kupfferschen Sternzellen abnimmt. Nach 48 Stunden fällt der H^3-

Index des Parenchyms auf den Kontrollwert ab, die Mitosetätigkeit nimmt weiter zu. Die Syntheseleistung des Mesenchyms erreicht fast den Nullwert. Am 5. Tag erreicht die DNS-Synthese beider Zellarten einen zweiten Gipfel mit Maximalwerten, während die Mitosezahl bei peroralem und intraperitonealer Application ein relatives Minimum aufweist. Nach 10 Tagen sind H^3- und Mitose-Index des Parenchyms zur Norm zurückgekehrt; die Mesenchymwerte sind erheblich abgefallen. Bemerkenswert ist, daß beide Applikationsarten zwar eine annähernd analoge Verlaufsform aufweisen, bei intraperitonealer Gabe jedoch alle Werte wesentlich niedriger liegen.

Uhrzeit	8	10	12	14	16	18	20	22	24	2	4	6
Zahl der Tiere	12	9	12	6	12	6	12	3	18	3	12	6
	65,3	57,2	57,5	54,3	54,6	53,0	52,2	53,9	53,5	60,7	58,3	50,7
	75,9	60,9	57,3	54,6	53,4	52,6	49,3	55,7	44,4	50,2	58,8	53,0
	63,3	60,0	58,1	56,5	58,6	62,3	53,4	55,0	47,7	53,6	54,9	59,8
	61,1	50,7	58,7	55,3	56,9	47,2	51,2		48,5		55,6	57,5
	55,9	55,3	59,1	51,4	53,4	57,3	54,6		49,3		56,5	56,6
	58,9	65,1	56,9	53,1	56,3	49,3	53,5		54,8		57,5	54,7
	60,7	59,6	65,5		54,5		56,3		52,7		49,1	
	53,0	50,5	63,2		54,3		58,1		59,5		52,5	
	61,2	59,5	65,1		57,9		69,0		54,7		62,5	
	61,8		50,0		54,5		52,0		52,3		54,4	
	63,2		50,8		57,5		47,9		54,7		55,1	
	63,2		54,5		52,4		48,5		51,4		59,0	
									51,6			
									52,7			
									52,3			
									51,7			
									44,2			
									52,6			
Mittelwert	60,3	57,6	58,0	54,2	55,3	53,5	53,8	54,9	51,6	54,8	56,1	59,0
Streuung	±1,17	±1,6	±1,38	±0,99	±0,58	±2,22	±1,18	±0,53	±0,88	±3,09	±1,15	±1,72
Signifikanz	Ø	Ø	Ø	0,001	0,001	0,02	0,001	0,001	0,001	Ø	0,02	Ø

(Vergleich gegenüber dem 8 Uhr-Wert)

Tabelle I: Tagesrhythmik des relativen Lebergewichtes in mg pro Gramm Körpergewicht.

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZg.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte Leberzellk. X	337	16725	-	340	14560	15	343	17176	6
	338	15937	-	341	16380	14	344	16986	1
	339	15450	-	342	14400	8	345	15450	2
Mittelwerte		16037			15110	12,3		16537	3
Markierte Doppelk. D	337	11275	-	340	1575	2	343	1785	-
	338	1725	-	341	1540	1	344	1634	-
	339	1464	-	342	1275	2	345	1387	-
Mittelwerte		1488			1463	1,6		1587	
X-D	337	15450	-	340	12985	13	343	15428	6
	338	15450	-	341	14840	13	344	15352	1
	339	13986	-	342	13125	6	345	14063	2
Mittelwerte		14549			13650	10,6		14950	3
Markierte Endothelz.	337		-	340	7980	47	343	4816	10
	338		-	341	5560	44	344	6902	15
	339		-	342	6834	46	345	7562	9
Mittelwerte					6791	45,6		6427	11,3
Leberzell= mitosen	337		-	340		3	343		-
	338		-	341		1	344		-
	339		1	342		1	345		1
Mittelwerte			0,3			1,6			0,3
Mitoseindex		0,002			0,011			0,002	
H^3-Index Leberzellk.		-----			0,077			0,02	
H^3-Index Endothelz.		-----			0,67			0,17	

Tabelle II für 24 Std. Versuch

I: nur Colchizin - II: H^3-Thymidin und Colchizin - III: nur H^3-Thymidin

0 (24) Uhr

Zählergebnisse der markierten Leberepithelzellen, Kupfferschen Sternzellen und der Leberzellmitosen (Einzelzählungen) Mitose- und H^3-Indices der Mittelwerte.

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte Leberzellk. X	346	16237	-	349	18080	1	352	22308	598
	347	17063	-	350	16090	5	353	19915	145
	348	17325	-	351	16650	244	354	15004	27
Mittelwerte		16875			16940	83,3		19075	256,6
Markierte Doppelk. D	346	1088	-	349	1920		352	1892	132
	347	1763	-	350	1875	1	353	3045	23
	348	1950	-	351	1970	56	354	1116	6
Mittelwerte		1600			1921	19		2017	53,6
X-D	346	15149	-	349	16160	1	352	20416	466
	347	15300	-	350	14215	4	353	16870	122
	348	15375	-	351	14680	132	354	13888	21
Mittelwerte		15274			15018	45		17058	203
Markierte Endothelz.	346		-	349	7920	5	352	12804	146
	347		-	350	6280	177	353	7770	191
	348		-	351	7425	51	354	6262	354
Mittelwerte					7208	77,6		8945	230,3
Leberzell= mitosen	346		1	349		1	352		-
	347		2	350		7	353		2
	348		1	351		7	354		3
Mittelwerte			1,3			5			1,6
Mitoseindex d.Leberzellen		0,008			0,034			0,009	
H^3-Index Leberzellk.		-----			0,29			1,3	
H^3-Index Endothelz.		----			1,08			2,57	

Fortsetzung Tabelle II für 24 Stdn. Versuch

4 Uhr

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte Leberzellk. X	355	16500	-	358	16111	99	361	17715	72
	356	15525	-	359	15088	42	362	15205	254
	360	15975	-	360	16600	19	363	17325	387
Mittelwerte		16000			15933	53,3		16748	273,6
Markierte Doppelk. D	355	1200	-	358	1530	30	361	1875	17
	356	1213	-	359	1476	11	362	1450	59
	357	1163	-	360	1071	1	363	2100	96
Mittelwerte		1192			1359	14		1808	57,3
X-D	355	15300	-	358	14581	69	362	13755	195
	356	14312	-	359	13612	31	362	13755	195
	357	14812	-	360	15529	18	363	15225	291
Mittelwerte		14808			14574	39,3		14940	180,3
Markierte Endothelk.	355		-	358	7470	31	361	6525	39
	356		-	359	7462	41	362	5494	86
	357		-	360	6732	355	363	7575	37
Mittelwerte					7221	142,3		6531	54
Leberzell= mitosen	355		1	358		18	361		24
	356		2	359		2	362		2
	357		4	360		3	363		11
Mittelwerte			2,3			7,6			12,3
Mitoseindex der Leberz.		0,016			0,05			0,08	
H^3-Index Leberzellen		-----			0,27			1,2	
H^3-Index Endothelz.		-----			1,97			0,83	

Fortsetzung 2: Tabelle II für 24 Stunden Versuch

8 Uhr

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte Leberzellk. X	304	15900	-	307	16110	58	310	15160	130
	305	15850	-	308	20617	40	311	17615	65
	306	17550	-	309	17745	31	312	16354	145
Mittelwerte		16433			18157	43		16376	103
Markierte Doppelk. D	304	1200	-	307	1305	10	310	1538	30
	305	1725	-	308	1819	6	311	2100	14
	306	1950	-	309	1950	6	312	1702	36
Mittelwerte		1625			1691	7,3		1780	26,6
X-D	304	14700	-	307	14805	48	310	13622	73
	305	14125	-	308	18798	34	311	15515	51
	306	15600	-	309	15795	25	312	14652	105
Mittelwerte		14808			16466	35,6		14596	76,3
Markierte Endothelz.	304		-	307	10845	64	310	7050	58
	305		-	308	5457	188	311	9750	26
	306		-	309	7340	103	312	6882	58
Mittelwerte					7880	118,3		7894	46,6
Leberzell= mitosen	304		8	307		107	310		134
	305		13	308		103	311		37
	306		96	309		56	312		76
Mittelwerte			39			88,6			82,3
Mitoseindex der Leberz.		0,26			0,54			0,56	
H^3-Index Leberzellk.		----			0,22			0,52	
H^3-Index Endothelz.		----			1,55			0,59	

Fortsetzung 3: Tabelle II für 24 Stunden Versuch

12 Uhr

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte Leberzellk. X	316	19825	-	319	14880	11	322	17325	32
	317	17100	-	320	19390	44	323	20330	21
	318	17550	-	321	13500	5	324	22125	13
Mittelwerte		18158			15923	20		19926	22
Markierte Doppelk. D	316	2475	-	319	2160	3	322	1725	-
	317	1650	-	320	1855	4	323	2698	5
	318	1612	-	321	1275	1	324	2400	2
Mittelwerte		1912			1763	2,6		2274	2,3
X-D	316	17350	-	319	12720	8	322	15600	32
	317	15450	-	320	17535	40	323	17632	16
	318	15938	-	321	12225	4	324	19725	19,6
Mittelwerte		16246			14160	17,3		17652	19,6
Markierte Endothelz.	316		-	319	8400	51	322	7463	110
	317		-	320	10395	216	323	6802	20
	318		-	321	6225	53	324	6600	46
Mittelwerte					8340	106,6		6955	58,6
Leberzell= mitosen	316		16	319		8	322		4
	317		3	320		103	323		32
	318		25	321		30	324		2
Mittelwerte			14,6			47			12,6
Mitoseindex der Leberz.		0,089			0,28			0,067	
H^3-Index Leberzellk.		-----			0,12			0,11	
H^3-Index Endothelz.		-----			1,28			0,84	

Fortsetzung 4: Tabelle II für 24 Stunden Versuch

16 Uhr

	I			II			III		
	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z	Nr.	GZz.	Z
Markierte	328	15825	-	331	17915	7	334	14560	292
Leberzellk.	329	16350	-	332	15760	47	335	14380	16
X	330	15722	-	333	21480	37	336	16425	51
Mittelwerte		15965			18385	30,3		15122	119,6
Markierte	328	1200	-	331	2400	1	334	1680	66
Doppelk.	329	1462	-	332	1280	14	335	2063	3
D	330	1200	-	333	3520	12	336	2400	16
Mittelwerte		1267			2400	9		2048	28,3
X-D	328	14625	-	331	15515	6	334	12880	226
	329	14888	-	332	14480	33	335	12317	13
	330	14522	-	333	17960	25	336	14025	35
Mittelwerte		14678			15985	21,3		13074	91,3
Markierte	328		-	331	8550	32	334	6320	113
Endothelk.	329		-	332	7600	100	335	8927	369
	330		-	333	9920	59	336	6750	107
Mittelwerte					8690	63,6		7332	196,3
Leberzell=	328		4	331		2	334		-
mitosen	329		3	332		23	335		1
	330		10	333		39	336		2
Mittelwerte			5,6			21,3			1,0
Mitoseindex der Leberz.		0,038			0,13			0,0076	
H^3-Index Leberzellk.		-----			0,13			0,69	
H^3-Index Endothelz.		-----			0,73			2,68	

Fortsetzung 5: Tabelle II für 24 Stunden Versuch

20 Uhr

Tabelle III: DNS-Synthese u.Mitosehäufigkeit bei pharmak.indz.Lebervergrößerung (Mittelwerte)

	Halothan	Phenobarbital p.o.	Phenobarbital i.p.	Halothan + Phenobarbital
24-Std.-Versuch				
H^3-Index Leberzellk.	0,0068	0,49	0,31	0,0039
H^3-Index Endothelz.	0,71	0,60	0,073	0,12
Mitoseindex d.Leberzellen	-	0,56	0,13	0,0039
48-Std.-Versuch				
H^3-Index Leberzellk.	0,052	0,11	0,058	0,052
H^3-Index Endothelz.	0,01	0,05	0,03	0,49
Mitoseindex d.Leberzellen	0,0021	0,86	0,19	0,041
5-Tage-Versuch				
H^3-Index Leberzellk.	0,4	0,63	0,35	0,094
G_m	$\pm$0,05	$\pm$0,05	-	-
H^3-Index Endothelz.	1,83	2,23	0,98	0,89
Mitoseindex d.Leberz.	0,58	0,22	0,024	0,74
G_m	$\pm$0,02	-	-	-
10-Tage-Versuch				
H^3-Index Leberzellk.	0,15	0,11	0,048	0,12
H^3-Index Endothelz.	0,51	1,31	0,44	0,38
Mitoseindex d.Leberzellen	0,18	0,087	0,018	-

Literatur

Bruce,A., M.D.
Drury,R., M.D. a.
Brues,C.
A Quantitative Study of Cell Growth in Regenerating Liver

Bade,E.G.
Sadnik,I.L.
Pilgrim,C. a.
Maurer,W.
Autoradiographic Study of DNA-Synthesis in the Regenerating Liver of the Mouse.
Virchows Arch.pathol.Anat. 337, 503 (1964)

Bänder,A.
Über Tagesperiodische Schwankungen einiger vegetativer Funktionen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path. 208 (1949) 217

Barnum,C.P.
Jardetzky,Chr.D. a.
Halberg,F.
Time Relations Among Metabolic and Morphologic 24-Hour Changes in Mouse Liver.
Amer.J.Physiol. 195, 301-310 (1958)

Bullough,W.S.
The relation between the epidermal mitotic activity and the blood suggar level in the adult male mouse Mus musculus.
L.f.Exp.Biol. 26, 83-99 (1949)

Forsgren,E.
On the relationship between the formation of bile and glycogen in the liver of rabbit.
Scand.Arch.Physiol. 53, 137-151 (1928)

Grisham,J.W.
Desoxyribose Nucleic Acid Synthesis and Cell Renewal in Regenerating Rat Liver.
J.Histochem.Cytochem. 8, 330 (1960)

Holmgren,H.
Studien über 24 24-stundrhythmische Variationen des Darmes, Lungen und Leberfettes.
Acta Med.Scand.(Suppl.), 74, 1-202 (1936)

Jaffé,J.J.
Diurnal Mitotic Periodicity in Regenerating Rat Liver.
Anat.Rec. 120, 935-954 (1954)

Kunz,W.
Schaude,G.
Schmid,W.
Siess,M.
Lebervergrößerung durch Fremdstoffe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u. exp.Path. 254, 470-488 (1966)

Kunz,W.
Schaude,G.
Schmid,W.
Siess,M.
Stimulation of Liver Growth By Drugs
I. Morphological Analysis
Reprinted from Excerpta Medica,
Internat.Congress Series No.115 (1966)

Kunz,W.
Schaude,G.
Schimassek,H.
Schmid,W.
Siess,M.
Stimulation of Liver Growth by Drugs.
II. Biochemical Analysis
Reprinted from Excerpta Medica
Internat.Congress Series No.115

Pilgrim,C.
Erb,W. a.
Maurer,W.
Diurnal Fluctuations in the Numbers of DNS Synthesizing Nuclei in various Mouse Tissues.
Nature 199, 863, August 31, 1963

Preis,Chr.
Schaude,G.
Siess,M.
Histometrische Analyse der Leberver=größerung nach chronischer Einwirkung von Barbituraten und Halothan.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u. exp.Path. 254, 489-504 (1966)

Schulte-Hermann,R.
Schlicht,I.
Magour,S.
Koransky,W.
Leberwachstum und mikrosomale Redoxenzyme unter dem Einfluß indu=zierender Substanzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u. exp.Path. 255, 72-73 (1966)

Schulte-Hermann,R.
Schlicht,I.
Magour,S.
Koransky,W.
Wachstum und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluß von Fremdstoffen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u. exp.Path. 257, 331 (1967)

Siess,M.
Schmidt,B.
Oehmig,H.
Kirchner,E.
Bruns' Beiträge zur klinischen Chirur=gie, Bd. 206, H. 4 (1963),
Verl. Urban und Schwarzenberg

Stöcker,E.
Klinge,O.
Die DNS-Synthese in der Leber weißer Mäuse nach Colchizin
(Autoradiographische Untersuchungen mit H^3-Thymidin)
Naturwissenschaften 2, 39 (1965)

Lebenslauf

Am 26. April 1941 wurde ich als drittes Kind des Anatomen Dr. Klaus Niessing und seiner Ehefrau Lydia geb. Bieker in Freiburg geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Freiburg, Leipzig und Marburg. Nach vier Jahren Grundschule in Marburg besuchte ich die dortige Elisabeth-Schule und bestand im Frühjahr 1962 das Abitur. In Marburg und Kiel studierte ich fünf Semester bis zur ärztlichen Vorprüfung. Seit November 1965 arbeitete ich am Pharmakologischen Institut an meiner Dissertation.
Das Staatsexamen beendete ich am 18. 12. 1967.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Dimroth, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk, Heuser, Hildebrandt, Jakob, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Niessing, Petry, Pots, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle;

in Kiel: Bargmann, Knese, v.Kügelgen, Lullies, Netter, Ohlenbusch, Oksche.